

УДК 633.854.78:575

ОЦІНКА РІЗНОМАНІТТЯ РОБОЧОЇ КОЛЕКЦІЇ БАТЬКІВСЬКИХ ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ ЗА ГЕНЕТИЧНИМИ ДИСТАНЦІЯМИ

В.В. Кириченко, О.А. Сивенко

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН

За результатами проведених досліджень вивчено 100 інбредних ліній соняшнику за допомогою RAPD-аналізу, рівень поліморфізму яких варіював від 33,3% до 69,2%. На основі даних RAPD-аналізу розраховано генетичні дистанції між інбредними лініями та побудовано дендрограму. За генетичними дистанціями виділено 7 наявних груп, для кожної групи виявлені пари ліній. За результатами ПЛР-аналізу підібрано інбредні лінії з різними генетичними дистанціями для проведення схрещування між ними і отримано гібридні комбінації.

Соняшник, батьківські лінії, RAPD-аналіз, генетичні дистанції

Соняшник є однією з найбільш цінних олійних культур, яка займає значні посівні площі в Україні. На його частку приходить 12,5% виробництва усіх олій у світі. Зростання вимог по забезпеченню населення рослинною олією та насінням потребує зростання валового збору соняшнику. В даний час безперечним є той факт, що подальше збільшення валових зборів товарного соняшнику може бути досягнуте насамперед за рахунок упровадження у виробництво високоврожайних гібридів соняшнику, екологічно пластичних та стійких до основних патогенів.

Селекціонерами створено значне різноманіття вихідного лінійного матеріалу соняшнику, який має забезпечити успішне створення високогетерозисних гібридів різних груп стиглості з високим потенціалом урожайності і якісними показниками. На теперішній час колекції ліній, особливо батьківського типу, налічують сотні номерів. Виникає необхідність у систематизації цього матеріалу, спрямованого на добір найкращих з них. Тестування ліній вимагає проведення значного об'єму робіт, у зв'язку з чим бажано залучати до схрещування лише найкращі генетично різноманітні лінії з прогнозованою їх високою цінністю [1]. Залучення до схрещувань генетично близьких ліній є неефективним шляхом пошуку найкращих гібридних комбінацій. Визначити генетичну близькість або віддаленість ліній лише за морфологічними ознаками недостатньо. Викорис-

тання поряд з традиційними оцінками біотехнологічних методів на основі ПЛР-аналізу, які спрямовані на визначення генетичних дистанцій, дозволить ідентифікувати і класифікувати лінії [2]. За допомогою ПЛР-аналізу можна отримувати більш надійну класифікацію вихідного матеріалу [3]. Аналіз довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD) дозволить вивчити генетичне різноманіття ліній соняшнику [4-7]. Крім того, можна оптимізувати підбір ліній для схрещування та підвищити ефективність традиційного селекційного процесу.

Матеріалом для досліджень були 100 ліній соняшнику, взяті з робочої колекції лабораторії селекції та генетики соняшнику Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН. З них 90 ліній-відновників фертильності пилку та 10 материнських ліній. Лінії різнились за походженням, тривалістю вегетаційного періоду, морфотипом, олійністю, жирнокислотним складом та стійкістю до основних хвороб.

Для кожної лінії виділяли ДНК з 10 етіюльованих п'ятиденних паростків СТАВ методом. Для проведення ПЛР-аналізу використовували ліофілізовані набори (GenPak PCR core) з додаванням 20 нг ДНК и 0,2 мкМ довільного праймера. Зверху реакційної суміші нашаровували 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію проводили в ампліфікаторі «Терцик» при наступних умовах: початкова денатурація – 5 хв., 94°C – один цикл; послідовні 45 циклів: денатурація – 1 хв., 94°C, відпал праймера – 1 хв., 36°C, елонгація – 2 хв., 72°C; заключна елонгація 7 хв., 72°C – один цикл.

Продукти ампліфікації аналізували методом електрофорезу в 2%-му агарозному гелі в $1 \times$ TBE та візуалізували бромистим етидієм (1мкг/мл).

Отримані дані обробляли за допомогою комп'ютерної програми «TotalLab LT120». Кластерний аналіз та побудову дендрограми проводили за допомогою програми «PHYLIP».

Молекулярний аналіз проводили шляхом ампліфікації ДНК з використанням 8-ми праймерів довільної нуклеотидної послідовності, розроблені фірмою Operon Technologies (OPP-10, OPW-06, OPW-10, OPW-04, OPA-11, P-28, P-39, P-52) (табл. 1).

Результати дослідження показали внутрішньолінійну однорідність генотипів. Продукти ампліфікації варіювали від ~133 до ~3854 п.н. Рівень поліморфізму коливався від 33,3% до 69,2%. В середньому він склав 52,8%. Всього проаналізовано 91 локус. На основі отриманих даних створена вихідна матриця для розрахунку генетичних дистанцій між інбредними лініями соняшнику. За допомогою кластерного аналізу побудовано дендрограму, яка наявно демонструє генетичну схожість ліній (рис. 1).

Таблиця 1.

Характеристика праймерів та рівень поліморфізму ДНК у лінії соняшника

Праймер	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'	Кількість локусів, шт.	Поліморфізм, %	Розмір фрагменту ДНК, п. н.	
				Min.	Max.
OPA-11	CAATCGCCGT	13	46,2	288	1583
OPP-10	TCCCGCCTAC	13	61,5	133	2021
OPW-04	CAGAAGCGGA	12	58,3	239	2616
OPW-06	AGGCCCGATG	9	55,5	204	1755
OPW-10	TCGCATCCCT	9	33,3	276	1663
P-28	CAAACGTCGG	13	53,8	238	3854
P-39	CCAGTTCGCC	13	69,2	149	2238
P-52	AGGACTGGAC	9	44,4	289	2640

Лінії: 1- X720B, 2-X526B, 3-X711B, 4-X762B, 5-X782B, 6-X785B, 7-X843B, 8-1228B, 9-X224B, 10-X04164B, 11-X114B, 12-X1026B, 13-X04173B, 14-X480B, 15-X080B, 16-X084B, 17-X085B, 18-X1017B, 19-X460B, 20-X1015B, 22-X854B, 23-X947B, 24-X1023B, 25- X1074B, 26-X1233B, 27-X1342B, 28-X04106B, 31-X04122B, 32-X04131B, 34-X04151B, 35-X04102B, 37-X04128B, 39-X1064B, 40-X04101B, 42-X04175B, 43-XMat05460B, 44-X05205B, 45-X05211B, 46-X05215, 47-X06102B, 48-X06105B, 49-X06107B, 50-X06113B, 51-X05202B, 53-X06138B, 54-X06135B, 55-X06136B, 56-X0761B, 57-X0765B, 58-X71007B, 59-X72207B, 60-X72507B, 61-X73107B, 62-X73207B, 63-X73607B, 64-X74307B, 65-X0807B, 66-X0819B, 67-X0814B, 68-X06139, 69-X0820B, 70-XCy044B, 72-X1083B, 73-X1348B, 74-X04177B, 75-X1229B, 76-X04112B, 77-X04109B, 78-X1012B, 80-X04113B, 81-X05350B, 82-X671B, 83-X06134B, 84-X05357B, 85-X391B, 87-X08126B, 88-X04153B, 89-X135B, 90-X1086B, 91-Cx1008A, 92-Cx503A, 93-Cx2111A, 94-Cx2122A, 95-Cx1006A, 96-Cx1010A, 97-Mx42A, 98-Mx524A, 99-Mx53/10A, 100-Mx845A×Mx53/10B.

При аналізі отриманої дендрограми виділено 7 наявних кластерів, в яких згруповано лінії з найменшими генетичними дистанціями. Між кластерами виявлені пари ліній з найбільшими генетичними дистанціями.

Результати ПЛР-аналізу показали, що лінії соняшнику значно різняться за генетичними дистанціями між материнськими і батьківськими лініями (0,008 – 0,060).

Найбільш віддаленим за генетичними дистанціями між лініями-відновниками фертильності пилку та стерильними аналогами є:

1) Mx42A(№97) від X782B(№5), X73607B(№63), X480B(№14), X04112B(№76), X08126B(№87);

2) Cx1010A(№96) від X084B(№16), X72507B(№60);

3) Cx2111A(№93) від X04151B(№34), X04102B(№35), X08126B(№87) (табл.2).

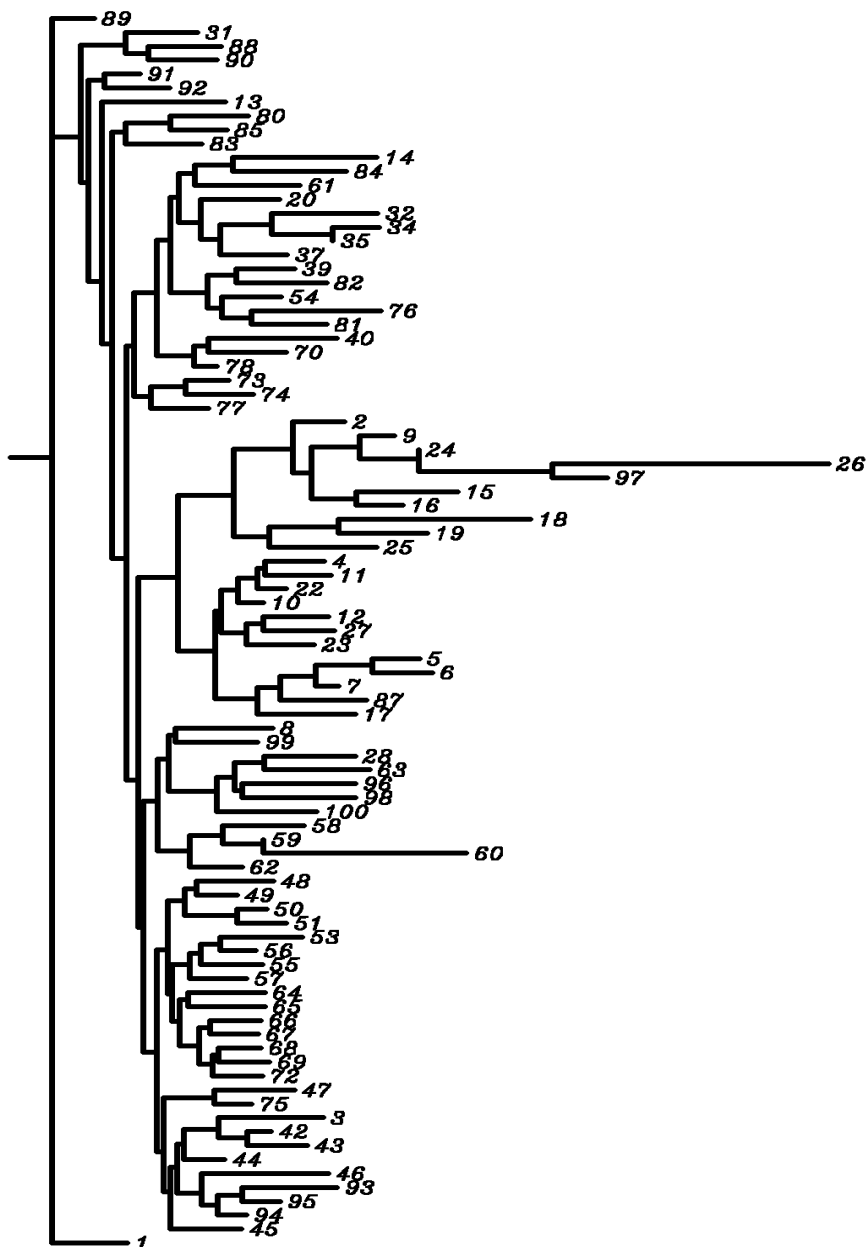


Рис. 1. Дендрограма генетичного взаємозв'язку між лініями соняшнику

Таблиця 2.

Найбільш генетично віддалені батьківські лінії соняшнику

Материнські лінії	Батьківські лінії	Генетична дистанція, d
Mx42A (№ 97)	X782B (№ 5)	0,052
Mx42A (№ 97)	X73607B (№ 63)	0,052
Mx42A (№ 97)	X480B (№ 14)	0,051
Mx42A (№ 97)	X04112B (№ 76)	0,050
Mx42A (№ 97)	X08126B (№ 87)	0,051
Cx1010A (№ 96)	X084B (№ 16)	0,060
Cx1010A (№ 96)	X72507B (№ 60)	0,051
Cx2111A (№ 93)	X04151B (№ 34)	0,054
Cx2111A (№ 93)	X04102B (№ 35)	0,056
Cx2111A (№ 93)	X08126B (№ 87)	0,041

Найбільш віддалені лінії будуть використовуватися для подальшого схрещування та отримання високогетерозисних гібридних комбінацій.

Найменш генетично-віддаленими є такі лінії:

- 1) Cx1008A(№91) від X720B(№1), X04122B(№31), та X06139B(№68); 2) Cx2122A(№94) від X04164B(№10), X05205B(№44), X06139B(№68); 3) Cx1010A(№96) та X04106B(№28);
- 4) Cx1006A(№95) від X1228B(№8), X04175B(№42), X05205B(№44) (табл.3).

Таблиця 3.

Найменш генетично віддалені батьківські лінії соняшнику

Материнські лінії	Батьківські лінії	Генетична дистанція, d
Cx1008A (№ 91)	X720B (№ 1)	0,009
Cx1008A (№ 91)	X04122B (№31)	0,009
Cx1008A (№ 91)	X06139B (№ 68)	0,008
Cx2122A (№ 94)	X04164B (№ 10)	0,010
Cx2122A (№ 94)	X05205B (№ 44)	0,008
Cx2122A (№ 94)	X06139B (№ 68)	0,009
Cx1006A (№ 95)	X1288B (№ 8)	0,011
Cx1006A (№ 95)	X04175B (№ 42)	0,010
Cx1006A (№ 95)	X05205B (№ 44)	0,009
Cx1010A (№ 96)	X04106B (№ 28)	0,012

Включення найбільш генетично близьких ліній в схрещування з метою отримання експериментальних гібридних комбінацій є неефективним у зв'язку з низькою вірогідністю отримання бажаного ефекту гетерозису. В цьому випадку, при умові селекційної цінності лінії, необхідним є подальший пошук пари для схрещувань.

Розподіл робочої колекції інбредних ліній соняшнику по групах дав змогу підібрати пари ліній для реалізації тестерної схеми схрещування отримання експериментальних гібридів. За результатами RAPD-аналізу відібрано 35 батьківських та 6 материнських ліній з різними генетичними дистанціями і проведено схрещування між ними. В результаті отримано близько 200 експериментальних гібридних комбінацій соняшнику, які в подальшому будуть вивчені у попередньому випробуванні.

Висновки. 1. Визначено рівень поліморфізму методом RAPD-аналізу та встановлені генетичні дистанції між лініями соняшнику, що дає можливість використання отриманих даних в селекційних роботах для підбору батьківських пар високогетерозисних гібридів.

2. Генетично віддалені лінії соняшнику залучено до схрещування для отримання експериментальних гібридів і вивчення рівня їх комбінаційної здатності та гетерозису.

Список використаних джерел

1. Кириченко В. В. Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). – Харьков, 2005. – С.4 – 17.
2. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acid. Res. 1990. V.18. p. 7213-7218.
3. Сиволап Ю. М. Геном рослин і «МОЛЕКУЛЯРНА СЕЛЕКЦІЯ» // Селекція і насінництво. – Харків, 2008. – Вип. 96. – С. 34 – 40.
4. Попов В. Н., Урбанович О. Ю., Кириченко В. В. Исследование генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника методами RAPD- и изоферментного анализов // Генетика. – 2002. – Т.38, №7. – С.937-943.
5. Сиволап Ю. М., Солоденко А. Е., Бурлов В. В. Исследование молекулярно-генетического разнообразия инбредных линий и уровня гетерозиса у гибридов подсолнечника // Цитология и генетика. – 1998, №6. – С.5-10.
6. Teulat B, Zhang Y. X., Nicolas P. Characteristics of random amplified polymorphic DNA markers discriminating *Helianthus annuus* inbred lines // Agronomie. – 1994. – V. 14, № 8. – P. 497-502.
7. Johus M., Nienhuis J., Hinrichsen P., Munoz C. RAPD analisis of *Phaseolus vulgaris* land-races from Chile // Int. Conf. on the Status Plant Genome Res. San Diego, 1995.

По результатам проведённых исследований изучено 100 инбредных линий подсолнечника с помощью RAPD-анализа, уровень полиморфизма которых варьировал от 33,3% до 69,2%. На основе данных RAPD-анализа рассчитаны генетические дистанции между инбредными линиями и построена дендрограмма. По генетическим дистанциям выделено 7 наивных групп, для каждой группы выявлены пары линий. По результатам ПЦР-анализа подобраны инбредные линии с различными генетическими дистанциями для проведения скрещивания между ними и получены гибридные комбинации.

According to the results of the study conducted 100 inbred lines of sunflower are investigated by RAPD - analysis, at this the level of polymorphism has varied from 33,3 % to 69,2 %. On the basis of the data from RAPD – analysis genetical distances between inbred lines are calculated and the dendrogram is built. By the genetical distances 7 available groups are distinguished, for each group pairs of lines are found. By the results of PCR – analysis the inbred lines with different genetical distances are chosen for crossing between them and hybridic combinations are received.